

Cecha męskiej sterylności u rzodkiewki (*Raphanus sativus* L.) – podłoże genetyczne i molekularne

***Anna Hawliczek-Strulak, Grzegorz Bartoszewski, Aleksandra Korzeniewska,
Katarzyna Niemirowicz-Szczytt***

*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu,
Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin,
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
e-mail: ahawliczek@gmail.com; katarzyna_niemirowicz@sggw.pl*

Słowa kluczowe: rzodkiewka, CMS, Ogura, *orf138*, *Rfo*, *PPR-B*, restorer

Wstęp

W populacjach rzodkiewki występuje cytoplazmatyczno-jądrowa męska sterylność (oznaczona tu jako CMS). System CMS *R. sativus* stał się jednym z najczęściej badanych na świecie, a ponadto jest wykorzystywany praktycznie w hodowli rzodkiewki, rzodkwi i rzepaku zarówno w Europie, jak i w Azji. Liczne badania naukowe, miały na celu dokładne opisanie czynników genetycznych kontrolujących pojawianie się roślin męskosterylnych oraz identyfikację i charakterystykę genów jądrowych mających zdolność przywracania płodności roślinom z CMS. Obecnie, w wyniku zastosowania nowych metod wykrywania mutacji w genomie mitochondrialnym, możliwe jest identyfikowanie roślin o sterylizującej cytoplazmie typu Ogura. Ponadto poznano sekwencje genów jądrowych *Rf* (ang. restorer of fertility), przywracających płodność roślinom z cytoplazmą typu Ogura. Dzięki tym odkryciom możliwe stało się wykorzystanie cytoplazmy typu Ogura w produkcji nasion mieszańcowych.

Charakterystyka gatunku *Raphanus sativus*

Raphanus sativus L. jest jednym z głównych gatunków roślin warzywnych uprawianych w Azji. W pozostałych częściach świata jest rośliną uprawianą na mniejszą skalę. Rodzaj *Raphanus* należy do rodziny *Brassicaceae* (kapustowate), oprócz zgrubienia korzeniowego ma wiele innych cech ważnych dla hodowców zajmujących się roślinami kapustnymi. Jedną z najważniejszych i najczęściej opisywanych w literaturze jest cecha cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności [28].

Pochodzenie męskiej sterylności

W trakcie ewolucji rośliny wyższe wytwarzały mechanizmy mające na celu promowanie allogamii (obcocylności), która z jednej strony ogranicza występowanie depresji wsobnej, a z drugiej przyczynia się do wzrostu heterozygotyczności, zróżnicowania genetycznego i poprawia wigor roślin mieszańcowych. W konsekwencji mechanizmy te przyczyniają się do lepszego przystosowania poszczególnych osobników, a tym samym gatunków, zapewniając im przetrwanie i rozwój [19]. Do najważniejszych mechanizmów zapobiegających samozapyleniu zaliczmy rozdzielność płciowość. W przypadku roślin o kwiatach hermafrodytycznych do mechanizmów sprzyjających obcocylności zaliczmy protogynię, protoandrię, heterostylię, samoniezgodność oraz sterylność męską lub żeńską. Ze wszystkich wyżej wymienionych systemów męska sterylność (MS), jest najbardziej efektywnym systemem wymuszającym obce zapylenie. Sterylność kwiatów może być warunkowana wyłącznie przez geny (jądrowe lub/i cytoplazmatyczne) albo czynniki środowiskowe, a może też być wynikiem współdziałania czynników genetycznych i środowiskowych [18].

Cytoplazmatyczno-jądrowa męska sterylność

Cytoplazmatyczno-jądrowa męska sterylność (CMS) może pojawiać się spontanicznie w materiale hodowlanym lub ujawniać się w potomstwie powstałym w krzyżowaniu oddalonym jako wynik wymiany genomów jądrowych i cytoplazmatycznych. CMS jest definiowana jako cecha dziedziczona jednorodzicielsko, matecznie, wynikająca z działania specyficznych genów mitochondrialnych, których ekspresja zaburza tworzenie żywotnego pyłku, nie zaburzając żadnych innych funkcji rośliny [7]. Formy męskosterylne zapyłone przez formę płodną wydają prawidłowy plon owoców i nasion. CMS została zidentyfikowana i scharakteryzowana u ponad 150 gatunków roślin [23]. W roślinach mających mitochondrialne geny wywołujące męską sterylność dochodzi do zahamowania mikrosporogenezy i/lub mikrogametogenezy, przez co nie powstaje żywotny pyłek.

Obecnie rośliny męskosterylne są również otrzymywane przy wykorzystaniu metod inżynierii genetycznej. Często wykorzystywaną metodą jest fuzja protoplastów, zwykle cybrydyzacja, polegająca na połączeniu genomu jądrowego jednego gatunku z genomem cytoplazmatycznym drugiego gatunku. W ten sposób można przenieść mitochondria z roślin MS do roślin płodnych [25].

Geny mitochondrialne związane z wytwarzaniem CMS

Większość z poznanych do dnia dzisiejszego genów wywołujących męską sterylność ma strukturę chimeralną i powstała prawdopodobnie w wyniku procesów rekombinacyjnych zachodzących w genomach mitochondrialnych. Zdarzenia rekombinacyjne mogły prowadzić do „zlepiania się” różnych nie powiązanych fragmentów genów mitochondrialnych, a w konsekwencji do powstania nowych otwartych ramek

odczytu. Wspólną cechą, zróżnicowanych zazwyczaj genów związanych z CMS, jest obecność w ich sekwencji fragmentów mitochondrialnych genów (na przykład: *atp6*, *atp8*, *atp9*, *cox2* i *nad3*) regulujących podstawowe procesy metaboliczne [30]. Ponadto geny CMS są zazwyczaj kotranskrybowane z genami mitochondrialnymi, niezwiązanymi z cechą MS, ale pełniącymi kluczowe funkcje dla komórek [7, 14]. Wiele białek związanych z wytwarzaniem cechy MS powstaje w wyniku translacji bocystronowych mRNA. Jednoczesna ekspresja genów CMS z innymi, niezbędnymi dla funkcjonowania komórki genami, wydaje się zapobiegać rekombinacyjnej eliminacji genów wywołujących męską sterility [1].

Funkcja białek kodowanych przez geny CMS nadal pozostaje nieznana. Brak też jednoznacznej odpowiedzi na pytanie dlaczego zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów ujawniają się tylko w tkankach pylnikowych i manifestują pod postacią męskiej sterility. Mechanizm wpływający na tkankową specyficzność cechy jest prawdopodobnie bardzo złożony.

Geny jądrowe przywracające płodność

W przypadku cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterility negatywny wpływ białek CMS może być znoszony przez produkty jednego lub większej liczby genów jądrowych zwanych restorerami (*Rf* – ang. **R**estorer of **f**ertility). Rośliny zawierające w genomie jądrowym gen(y) restorujące, wytwarzają żywotny, funkcjonalny pyłek, mimo obecności mitochondrialnych genów CMS [20]. Ujawnienie genów przywracających płodność bywa często wynikiem krzyżowania rośliny męskosterylnej z płodną rośliną o odmiennym genotypie. Niektóre allele genów jądrowych podtrzymują CMS, inne wpływają na przywrócenie płodności.

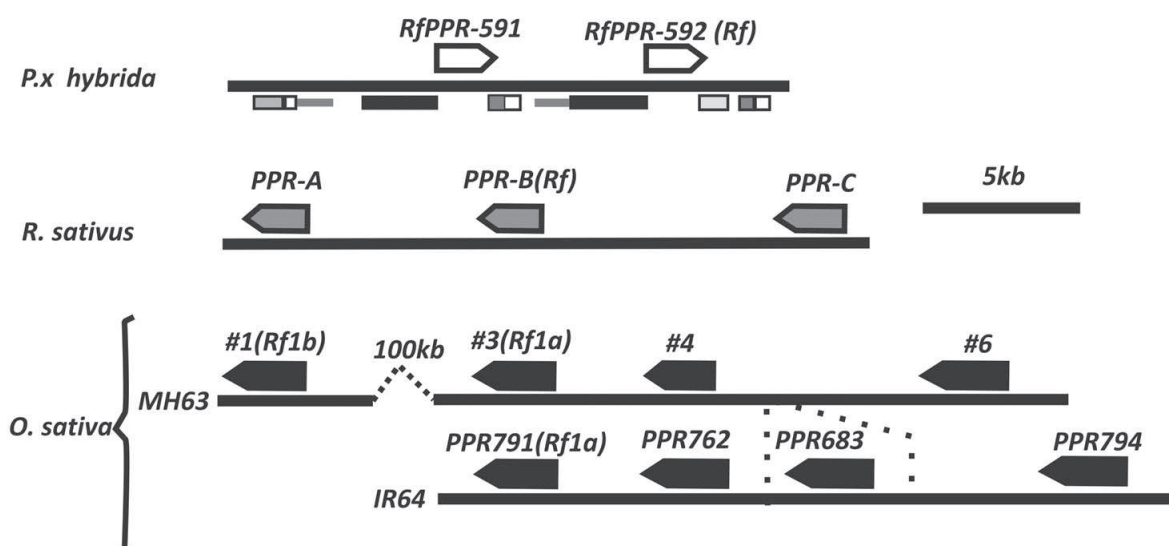
Geny regulujące przywracanie płodności (*Rf*) zostały sklonowane u wielu gatunków roślin. Jako pierwszy sklonowany został gen *Rf2* kukurydzy, kodujący białko wykazujące aktywność dehydrogenazy aldehydowej [24]. Allel *Rf2* przywraca płodność roślinom MS z cytoplazmą typu T, tylko w obecności genu restorującego w locus *rf1* [35]. Z wyjątkiem tego genu, wszystkie pozostałe sklonowane geny *Rf* kodują białka składające się z tandemowo ułożonych 35 aminokwasowych motywów i należą do rodziny białek określanych jako PPR (ang. **P**entatricopeptide **R**epeat **P**roteins). Geny z grupy PRP regulujące przywracanie płodności sklonowano między innymi u petunii [3], ryżu [33] i rzodkiewki [6, 8, 21].

Liczne badania genetyczne i biochemiczne mające na celu ustalenie mechanizmu działania białek PPR wskazują, że łączą się one bezpośrednio ze specyficznym RNA i tym samym, przez potranskrypcyjny splicing, obróbkę, edycję lub destabilizację mRNA wpływają na regulację inicjacji translacji [22, 13]. Inny mechanizm działania wykazuje gen *Rfo* (restorer *R. sativus*), który nie działa na poziomie mRNA natomiast prowadzi do destabilizacji białka ORF138 [2].

Cechą wspólną, łączącą różne loci regulujące przywracanie płodności, jest fakt, że często zawierają kilka podobnych genów PPR (rys. 1). Między innymi gen *RfPPR592* petunii flankuje gen *RfPPR591*. Sekwencje kodujące tych dwóch genów są identyczne w 93% [3]. Stwierdzono jednak liczne duplikacje i rearanżacje w rejonach: promotorowym i 3'UTR genów *RfPPR591* i *RfPPR592*.

R. sativus ma locus *Rfo* zawierający trzy podobne geny: *PPR-A*, *PPR-B*, *PPR-C*, których sekwencje nukleotydowe wykazują minimum 72% identyczności [6, 8] (rys. 1). Gen *Rfla* ryżu poprzedza (w zależności od linii), dwa lub trzy inne geny PPR o identycznej sekwencji [33] (rys. 1). W locus *Rf1* zidentyfikowano dziewięć homologów genu *Rf*. Istotne wydaje się, że tylko jeden gen PPR z całej grupy pełni funkcję rzeczywistego restorera [33]. Fakt, że geny, których sekwencja jest w 93,2% identyczna z sekwencją restorera *Rfla*, nie mają zdolności przywracania płodności roślinom męskosterylnym, może wskazywać, że nawet niewielkie zmiany sekwencji aminokwasowej genów PPR mogą prowadzić do utraty funkcji białka.

Jest wysoce prawdopodobne, że geny CMS i jądrowe restorery koewoluowały na zasadzie licznych 'prób i błędów', co w konsekwencji doprowadziło do powstania genów *Rf* pełniących funkcję restorerów znoszących działanie genów cytoplazmatycznych. Przyjmuje się, że restorery z grupy PPR funkcjonują jako geny dominujące nad genami CMS [12]. Jednakże, uwzględniając fakt, że CMS jest wynikiem niekompatybilności pomiędzy jądrem komórkowym a mitochondriami, można przypuszczać, że istnieją recesywne geny *rf*. Tego typu restorer, powstały na zasadzie „utruty funkcji”, został opisany u kukurydzy S-CMS [34]. Dominujący allel genu restorera (*Rfl1*) jest pozytywnie skorelowany z akumulacją podjednostki A syntazy ATP (ATPA). ATPA może oddziaływać z produktem genu *orf355-orf77* prawdopodobnie



Rysunek 1. Schematyczne przedstawienie struktury loci *Rfo* u 3 gatunków roślin. Strzałki wskazują rejony ORF genów PPR. Geny PPR w obrębie gatunku wykazują podobieństwo sekwencji min. 72%. U petunii zaznaczono rejony zduplikowane. Rf – funkcjonalny restorer. Schemat zmodyfikowany za Fujii i Toriyama [20]

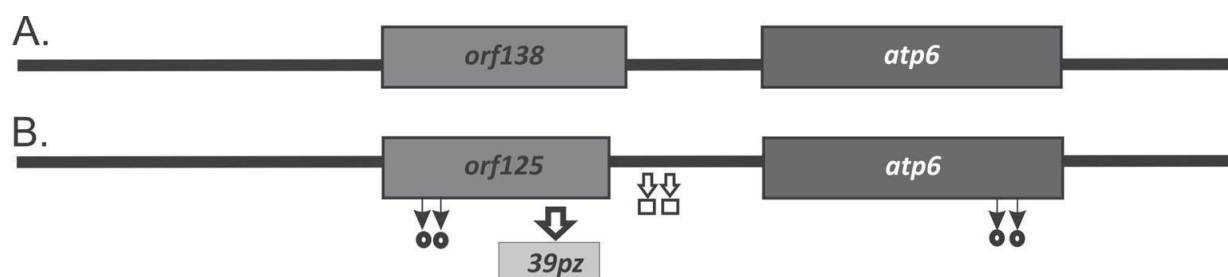
wywołując męską sterility. W przypadku braku *Rfl1*, w tkankach haploidalnych, przywracana jest płodność. Rośliny homozygotyczne *rfl1rfl1* są letalne ponieważ nie akumulują ATPA w mitochondriach. Identyfikacja genu *rfl1* była możliwa, ponieważ przywracanie płodności u kukurydzy (S-CMS) zachodzi w tkance haploidalnej (pyłek), w której nie obserwuje się dominacji i recesywności alleli.

Męska sterility *R. sativus*

Męska sterility w populacji *R. sativus*, po raz pierwszy została opisana przez Ogura [28] w Japonii. Cecha ta ma charakter cytoplazmatyczno-jądrowy. Od momentu odkrycia, system CMS *R. sativus* stał się jednym z najczęściej badanych na świecie. Badania cytologiczne wykonane przez Ogura [28] wykazały, że rozwój komórek macierzystych mikrospor przebiega prawidłowo do momentu powstania mikrospor, które bardzo szybko zaczynają zamierać, nie przekształcając się w ziarna pyłku. Obumieranie mikrospor jest w przypadku rzodkwi skorelowane z przedwczesną degradacją tapetum, co prawdopodobnie prowadzi do zaburzeń dostarczania składników pokarmowych dla tworzących się ziaren pyłku. Degradacja komórek tapetum zbiega się w czasie ze zmianami morfologicznymi pylników, które znacząco się zmniejszają i bieleją [28].

Niezdolność roślin do wytwarzania żywotnego pyłku jest wynikiem obecności genu *orf138* w genomie mitochondrialnym [10]. *Orf138* składają się z dwóch ko-transkrybowanych otwartych ramek odczytu: *orf138* i *orfB* (inaczej *atp8*, kodujący ósmą podjednostkę syntazy ATP) [10] (rys. 2).

W odróżnieniu od wielu innych zidentyfikowanych białek wywołujących CMS, które składają się niejako z fragmentów innych, typowych dla mitochondriów białek, polipeptyd ORF138 nie ma struktury chimeralnej. Wykazano, że białko to tworzy kompleks białkowy (homopolimer) o wielkości 750kDa zintegrowany z wewnętrzną błoną mitochondrialną. Dokładny mechanizm jego działania nadal pozostaje nieokreślony [10]. Wyniki uzyskane przez Duroc i in. [10, 11] pozwalają wnioskować, że w mitochondriach sterylnych roślin kompleks ORF138 pełni funkcję kanału błono-



Rysunek 2. Porównanie budowy genu *orf138* z MS typu Ogura (A) oraz genu *orf125* z MS typu Kosena (B). Kółka oznaczają pojedyncze substytucje nukleotydowe, białe kwadraty wskazują delekcje punktowe. Jasnoszary prostokąt wskazuje miejsce delekcji w genie *orf125* długości 39pz. Zmodyfikowano za [30].

wego. W kilku opisanych wcześniej przypadkach, pokazano negatywny wpływ białek CMS, na stabilność i/lub aktywność niektórych białkowych kompleksów oddechowych u roślin MS [9, 29, 40]. W przypadku białka ORF138 nie obserwowano jednak negatywnego wpływu na rozmiar, stabilność, czy wydajność mitochondrialnych kompleksów łańcucha oddechowego [11]. Badania wykazały natomiast znaczne różnice w zużyciu tlenu przez mitochondria. Izolowane mitochondria roślin męskosterylnych zużywały ponad dwukrotnie więcej tlenu niż izolowane mitochondria roślin płodnych. Dodatkowe analizy pozwoliły postawić hipotezę, że istnieje mechanizm, który w organach wegetatywnych minimalizuje toksyczne działanie białka ORF138, natomiast nie jest on wystarczająco wydajny w pylnikach [11]. Yang i in. [39] wskazują, że zamieranie pyłku w roślinach MS typu Ogura może być wynikiem zakłócenia procesu syntezy flawonoidów. Autorzy wykazali znaczne obniżenie poziomu ekspresji syntazy chalkonowej w pylnikach *R. sativus* z cytoplazmą typu Ogura, w porównaniu z roślinami płodnymi. Wyniki różnych eksperymentów jednoznacznie wskazują, że białko ORF138 funkcjonuje niezależnie od innych („autonomicznie”). W świetle uzyskanych danych bardziej prawdopodobne wydaje się, że system CMS, w przypadku cytoplazmy Ogura, powstał w wyniku „zyskania funkcji genu” a nie dominującej mutacji defektywnej [11].

Na podstawie sekwencji genu mitochondrialnego *orf138*, wywołującego CMS [10] zaprojektowano startery, które umożliwiły wytypowanie nowych (innych niż te wyodrębnione przez Ogura) form rzodkiewki mających sterylizującą cytoplazmę [36, 37]. Niektóre męskosterylne rośliny *Raphanus* mają w genomie mitochondrialnym sekwencję odmienną od sekwencji specyficznej dla mitochondriów typu Ogura. Yamagishi i Terachi [38] zidentyfikowali rośliny *R. raphanistrum*, które miały gen *orf138* różniący się na poziomie sekwencji nukleotydowej dwiema substytucjami. Iwabuchi i in. [17] u rzodkwi odmiany ‘Kosena’ (kos) zidentyfikowali *orf125* zawierającą dwie substytucje aminokwasowe i 39 nukleotydową delecję w porównaniu z sekwencją typu Ogura. Yamagishi i Terachi [38] wykazali, że rośliny przywracające płodność roślinom z cytoplazmą specyficzną dla *R. raphanistrum*, przywracają również płodność liniom z cytoplazmą typu Ogura. Podobne rezultaty uzyskali Iwabuchi i in. [17], którzy badali przywracanie płodności w roślinach z cytoplazmą typu ‘Kosena’. Linie przywracające płodność roślinom kos-CMS, przywracały również płodność roślinom Ogura-CMS. Wyniki te sugerują, że te same lub działające wymiennie restorery znoszą działanie trzech różnych form genu mitochondrialnego.

Drugim czynnikiem kontrolującym płodność rzodkiewki są geny jądrowe. Wyniki uzyskane między innymi przez Nieuwhof [27] i Seok-Hyeon [31], którzy badali sposób dziedziczenia męskiej sterylności w różnych populacjach *R. sativus*, wskazują, że w kontrolę sterylności może być zaangażowany więcej niż jeden gen jądrowy. Geny te, prawdopodobnie, działają w sposób niezależny od siebie, co sprawia, iż nie wszystkie muszą być jednocześnie obecne w osobnikach podtrzymujących sterylność

lub przywracających męską płodność. Geny *Rf* były opisane w różnych odmianach *R. sativus* (europejskich [27], chińskich [21] i japońskich [38]). Wykazano również, że występują z dużą częstotliwością w nieuprawnnych formach japońskiej rzodkiewki oraz u gatunku *R. raphanistrum* [4].

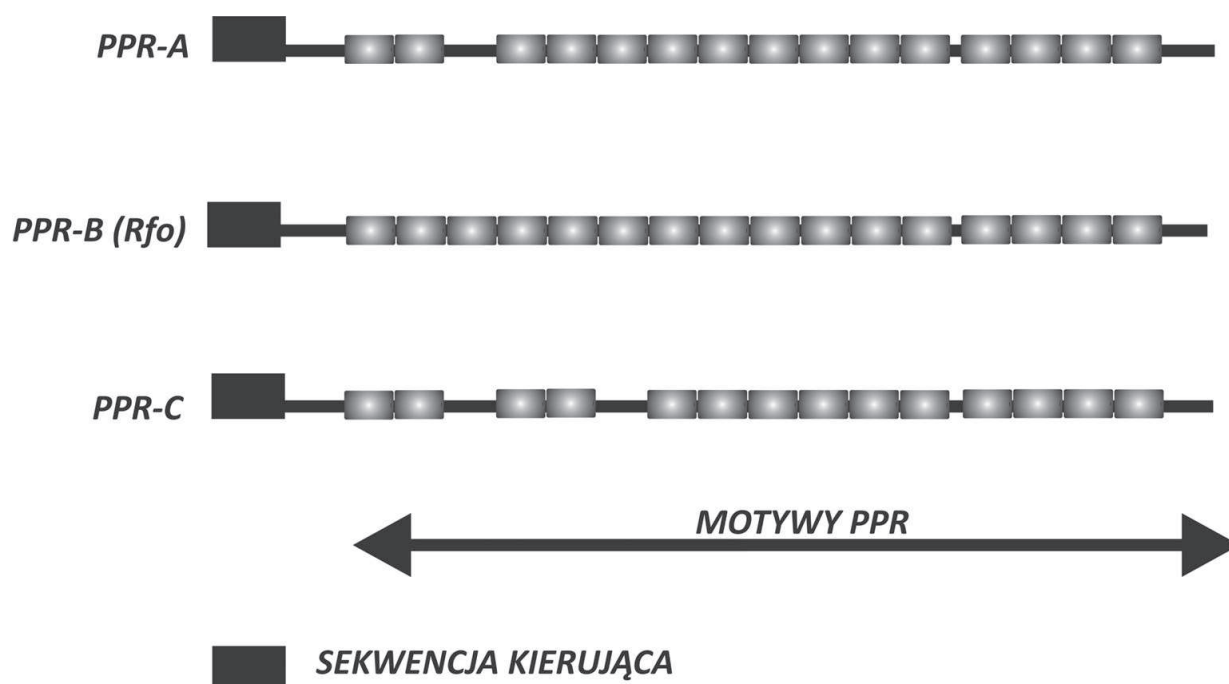
Zwykle jeden dominujący gen restorujący wyjaśnia większość obserwowanych w potomstwach stosunków rozszczeń. Zdarzają się przypadki, gdzie model z jednym genem nie wystarcza dla stosunków liczbowych występujących w potomstwie [4, 5, 31]. Model zakładający dwa dominujące geny współdziałające ze sobą w przywracaniu płodności roślinom z CMS potwierdzili w swoich badaniach między innymi: Yamagishi i Terachi [36] oraz Koizuka i in. [20].

Bonnet [5] i Nieuwhof [27], oceniając segregujące populacje, zaproponowali model, w którym w przywróceniu płodności roślinom z CMS mogły uczestniczyć dwa geny dominujące, działające niezależnie i jeden gen recesywny. Większość rozbieżności dotyczących liczby genów włączonych w proces restoracji wynika prawdopodobnie z faktu, że linie męskosterylne i dzikie formy rzodkiewki mogą potencjalnie mieć geny restorujące, które nie są uwidaczniane. Geny te ujawniają się dopiero w momencie, gdy do form potomnych zostanie wprowadzony nowy nierestorujący allel takiego genu pochodzący od jednej z wykorzystanych w krzyżowaniu form rodzicielskich.

Poza głównymi genami restorującymi, Nieuwhof [27] zasugerował istnienie genów modyfikatorów, które mogą mieć wpływ na cały system CMS u rzodkiewki. Obecność takich genów według autora mogłaby wyjaśniać pojawianie się męskosterylnych roślin w homozygotycznych populacjach roślin płodnych. Udowodniono również, że geny modyfikatory mogą zmieniać stabilność cechy, działając odmiennie w zależności od temperatury. W takim przypadku formy płodne w niskich (<17°C) lub wysokich (>20°C) temperaturach mogłyby być męskosterylne.

Obecnie zidentyfikowano i opisano jeden spośród obserwowanych genów jądrowych *Rf*, który hamując powstawanie białka ORF138, przywraca płodność roślinom o sterylnej cytoplazmie typu Ogura [6, 8, 21]. Niemalże jednocześnie w trzech różnych zespołach badawczych sklonowano gen przywracający płodność męskosterylnym roślinom z cytoplazmą typu Ogura. Sklonowany przez Koizuka i in. [21] gen restorujący pochodzący z chińskiej odmiany 'Yuan hong', nazwany *orf687* lub *Rfk* koduje białko z grupy PPR. Sekwencja tego genu jest identyczna z sekwencjami genu *Rfo* uzyskanymi przez dwie pozostałe grupy [6, 8] co pozwala przypuszczać, że powyższe prace dotyczą tego samego genu.

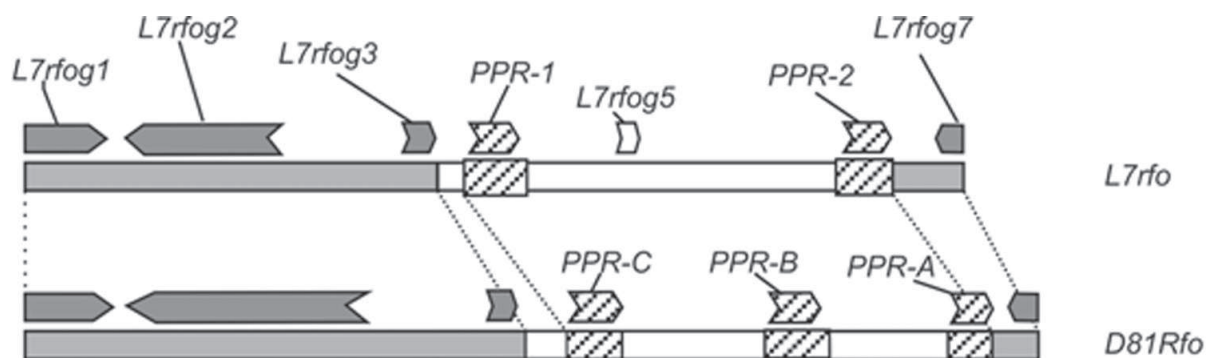
Locus *Rfo*, w obrębie którego znajduje się gen restorujący, składa się z trzech genów PPR ułożonych tandemowo, nazwanych *PPR-A*, *PPR-B* i *PPR-C*. Wielkości poszczególnych genów są zbliżone i wynoszą odpowiednio: 686, 687 i 654 kodonów. Liczba powtórzeń motywów PPR również jest różna i tak *PPR-A* zawiera 15 powtórzeń, *PPR-B* – 16, a *PPR-C* – 14 powtórzeń PPR (rys. 3). Wszystkie te geny przypuszczalnie kodują bardzo podobne białka. Analizy genetyczne potwierdziły, że



Rysunek 3. Schemat budowy genów *PPR-A*, *PPR-B* i *PPR-C* wchodzących w skład locus *Rfo*. Zmodyfikowano za [9].

właściwym restorerem jest gen *PPR-B#*, który koduje białko z grupy PPR, należące do podrodziny białek typu P [6, 8]. W porównaniu z białkiem *PPR-B*, przypuszczalne białko *PPR-A* ma dłuższy C-końcowy ogon oraz czteroaminokwasową delecję w obrębie trzeciego motywu PPR. Gen *PPR-C* zawiera 17pz delecję, co prowadzi do zmiany ramki odczytu i powstania przedwczesnego kodonu STOP, mniej więcej w połowie genu. Badania przeprowadzone przez Uyttewall i in. [32] potwierdziły, że *PPR-C* jest najprawdopodobniej pseudogenem. Pokazano, że właściwy restorer koduje 687 aminokwasowe białko zawierające sekwencję kierującą do mitochondriów. Koizuka i in. [21] sklonowali i zsekwencjonowali allel recesywny *rf#*, pochodzący z odmiany 'Kosena'. Wykazano, że białko kodowane przez allel nierestorujący od funkcjonalnego białka Rf różni się cztery substytucje aminokwasowe.

Mechanizm działania restorującego locus oraz funkcjonowanie opisanych białek PPR nie są do końca poznane. Badania Bellaoui i in. [2] pozwoliły stwierdzić, że obecność w roślinach MS genu *Rfo* znacząco obniża ilość białka ORF138 w pąkach kwiatowych. Najbardziej widoczny efekt obserwowano w tej samej fazie rozwojowej pylników, w której u roślin bez restorera uwidacznia się męskosterylny fenotyp. Pozwala to wnioskować, że restoracja związana jest z działaniem na poziomie potranskrypcyjnym, prawdopodobnie wpływając na destabilizację białka ORF138. Najnowsze badania są dowodem na wpływ różnego typu rearanzacji na strukturę i plastyczność locus *Rfo* [15]. Analiza wykonana dla linii nierestorującej L7 wykazała znaczne rearanzacje wewnątrz- i międzygenowe. Badany przez autorów allel (L7rfo) zawierał dwa geny (*PPR-1* i *PPR-2*), homologiczne z trzema opisanymi wcześniej genami *PPR* allelu restorującego linii D81 (*PPR-A*, *PPR-B*, *PPR-C*). Dwa nowo



Rysunek 4. Schematyczne porównanie 2 alleli locus *Rfo*. L7Rfo to sekwencja GeneBank nr FN397617 [41] wg [28], D81Rfo- sekwencja referencyjna GeneBank nr AJ550021 [15]. Szare prostokąty pokazują rejony kolinearne, o wysokiej homologii. Zakreskowane prostokąty pokazują rejony homologiczne, ale nie kolinearne. Białe prostokąty pokazują region linii L7Rfo, dla którego nie znaleziono rejonu korespondującego w locus *Rfo* linii D81Rfo; Strzałki wskazują geny oraz kierunek transkrypcji

opisane geny *PPR* były oddzielone od siebie innym nie związanym genem, który nie występował w locus *D18Rfo*. Autorzy na podstawie uzyskanych wyników wskazują, że locus *Rfo* i zawarte w nim geny *PPR* powstały na skutek inter- i intragenowej rekombinacji, czego wynikiem jest złożoność jego struktury. W cytowanej pracy porównano sekwencje pochodzące z linii restorującej D81Rfo i dopełniającej L7Rfo uzyskane w wyniku sekwencjonowania odpowiednich klonów pochodzących z bibliotek genomowych uzyskanych dla obu linii wykazując znaczne różnice w organizacji locus *Rfo* (rys. 4) [8, 15].

Produkcja odmian mieszańcowych z wykorzystaniem cechy męskiej sterility

Komercyjna produkcja odmian mieszańcowych wymaga opracowania systemu umożliwiającego kontrolę zapylania. Ręczne kastrowanie wykorzystywane jest u niewielu gatunków (np. papryka, pomidor), o wysokim współczynniku rozmnażania. Jedyną rośliną uprawną, u której można prowadzić mechaniczną kastrację formy matecznej na dużych arealach jest kukurydza. U innych gatunków w produkcji nasion mieszańcowych wykorzystywane są takie zjawiska jak: męska sterylność, rozdzielność płciowość lub samoniezgodność [26].

W hodowli odmian mieszańcowych rzodkiewki, wykorzystującej cechę męskiej sterility, niezbędne jest posiadanie linii męskosterylnej S(rforfo) oraz linii płodnej (dopełniającej) N(rforfo), która umożliwia rozmnażanie linii męskosterylnej. Linia dopełniająca powinna być tak dobrana, by po skrzyżowaniu z linią płodną w pokoleniu potomnym wszystkie rośliny były męskosterylne, czyli nie może zawierać genów jądrowych przywracających płodność. Komponenty wykorzystywane do krzyżowań powinny być ponadto wysoce homozygotyczne, co jest warunkiem ujawnienia się w pokoleniu F1 efektu heterozji. Dane literaturowe wskazują, że wyse-

lekcjonowanie odpowiednich materiałów, które mogłyby być następnie wykorzystywane w procesie tworzenia linii męskosterylnych i dopełniających, bardzo często napotyka na poważne trudności. Fenotypowa ocena roślin w polu oraz identyfikacja form płodnych i męskosterylnych jest bardzo czasochłonna i często bywa też nieprecyzyjna. Wskazują na to między innymi Nieuwhof [27] i Hossain i in. [16].

Podsumowanie

Cecha CMS w gatunku *R. sativus* występuje zarówno u roślin w środowisku naturalnym jak i w odmianach uprawnych. Obecnie rośliny męskosterylne z cytoplazmą typu Ogura są wykorzystywane w hodowli odmian mieszańcowych, między innymi rzodkiewki i rzepaku.

Zarówno w Europie jak i w Azji trwają intensywne badania mające na celu wyjaśnienie genetycznych mechanizmów wpływających na wytworzenie tej cechy. Badania przeprowadzone dotychczas wskazują na złożoność procesów, jakie uczestniczą w ewolucji mitochondrialnych i jądrowych genów odpowiedzialnych za wytworzenie CMS. Mitochondrialny gen *orf138*, charakterystyczny dla cytoplazmy typu Ogura reguluje proces degeneracji mikrospor w pylnikach, a w konsekwencji powstanie kwiatów męskosterylnych. Jego działanie znoszą jądrowe geny resorujące, mające zdolność przywracania płodności roślinom MS. Klasyczne badania genetyczne wykorzystujące krzyżowanie roślin MS i PŁ wskazują na obecność przynajmniej czterech różnych genów jądrowych mających zdolność przywracania płodności. Wykazano również, że geny jądrowe współdziałają ze sobą na zasadzie komplementacji bądź epistazy, a ich działanie może być modyfikowane przez geny modyfikatory oraz/lub warunki środowiska. Na poziomie molekularnym opisano i scharakteryzowano złożone locus *Rfo*, które zawiera gen *Rf* kodujący białko z rodziny PPR mające zdolność obniżania akumulacji białka ORF138. Dokładny mechanizm działania białek CMS nie jest do tej pory poznany.

Literatura

- [1] Bellaoui M., Martin-Canadell A., Pelletier G., Budar F. 1998. Low copy number molecules are produced by recombination, actively maintained and can be amplified in the mitochondrial genome of *Brassicaceae*. Relationship to reversion of the male sterile phenotype in some cybrids. *Mol. Gen. Genet.* 257: 177–185.
- [2] Bellaoui M., Grelon M., Pelletier G., Budar F. 1999. The restorer *Rfo* gene acts post-translationally on the stability of the ORF138 Ogura CMS-associated protein in reproductive tissues of rapeseed cybrids. *Plant Mol. Biol.* 40(5): 893–902.
- [3] Bentolila S., Alfonso A.A., Hanson M.R. 2002. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(16): 10887–10892.
- [4] Bett K.E., Lydiate D.J. 2004. Mapping and genetic characterization of loci controlling the restoration of male fertility in Ogura CMS radish. *Mol. Breed.* 13: 125–133.
- [5] Bonnet A. 1975. Introduction et utilisation d'une stérilité mâle cytoplasmique dans des variétés précoces Européennes de radis *Raphanus sativus* L. *Ann. Amélior. Plantes* 25: 381–397.

- [6] Brown G.G., Formanowa N., Jin H., Wargachuk R., Dendy C., Patil P., Laforest M., Zhang J., Cheung W.Y., Landry B.S. 2003. The radish Rfo restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J.* 35: 262–272.
- [7] Budar F., Pelletier G. 2001. Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *Life Sci.* 324(6): 543–550.
- [8] Desloire S., Gherbi H., Laloui W., Marhadour S., Clouet V., Cattolico L., Falentin C., Giancola S., Renard M., Budar F., Small I., Caboche M., Delourme R., Bendahmane A. 2003. Identification of the fertility restoration locus, Rfo, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Rep.* 4(6): 588–594.
- [9] Ducos E., Touzet P., Boutry M. 2001. The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes. *Plant J.* 26(2): 171–180.
- [10] Duroc Y., Gaillard C., Hiard S., Defrance M.C., Pelletier G., Budar F. 2005. Biochemical and functional characterization of ORF138, a mitochondrial protein responsible for *Ogura* cytoplasmic male sterility in *Brassicaceae*. *Biochimie* 87: 1089–1100.
- [11] Duroc Y., Hiard S., Vrielynck N., Ragu S., Budar F. 2009. The *Ogura* sterility-inducing protein forms a large complex without interfering with the oxidative phosphorylation components in rapeseed mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 70: 123–137
- [12] Fujii S., Toriyama K. 2008. Genome barriers between nuclei and mitochondria exemplified by cytoplasmic male sterility. *Plant Cell Physiol.* 49(10): 1484–1494.
- [13] Fujii S., Toriyama K. 2008. DCW11, down-regulated gene 11 in CW-type cytoplasmic male sterile rice, encoding mitochondrial protein phosphatase 2c is related to cytoplasmic male sterility. *Plant Cell Physiol.* 49: 633–640.
- [14] Hanson M.R., Bentolila S. 2004. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *The Plant Cell* 16: 154–169, Supplement 2004.
- [15] Hernandez Mora J.R., Rivals E., Mireau H., Budar F. 2010. Sequence analysis of two alleles reveals that intra- and intergenic recombination played a role in the evolution of the radish fertility restorer (Rfo). *BMC Plant Biol.* 10: 35.
- [16] Hossain M.A., Mian M.A.K., Rasul M.G. 2002. Investigations into the causes of segregation of *Ogura* male sterility in Bangladeshi cultivars of radish. *Plant Breed.* 121: 354–356.
- [17] Iwabuchi M., N. Koizuka, H. Fujimoto, T. Sakai, J. Imamura, 1999, Identification and expression of the kosena radish (*Raphanus sativus* cv. Kosena) homologue of the *ogura* radish CMS-associated gene, orf138. *Plant Mol. Biol.* 39: 183–188.
- [18] Kaul M.L.H., Frankel R., Grossmann M., Liskens H.F., Maliga P., Riley R. 1988. Male sterility in higher plants. Monographs on the Theor. Appl Genet., Springer Berlin Heidelberg New York: 132–169.
- [19] Kaul M.L.H. 1998. Male sterility in higher plants (Monographs on Theoretical and Applied Genetics). Springer, Berlin and Heidelberg.
- [20] Koizuka N., Imai R., Iwabuchi M., Sakai T., Imamura J. 2000. Genetic analysis of fertility restoration and accumulation of ORF125 mitochondrial protein in the Kosena radish (*Raphanus sativus* L. cv. Kosena) and a *Brassica napus* restorer line. *Theor. Appl. Genet.* 100: 949–955.
- [21] Koizuka N., Imai R., Fujimoto H., Hayakawa T., Kimura Y., Kohno-Murase J., Sakai T., Kawasaki S., Imamura J. 2003. Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, orf687, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. *The Plant J.* 34: 407–415.
- [22] Kotera E., Tasaka M., Shikanai T. 2004. A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433: 326–330.
- [23] Levings C.S.III, Vasil I.K. (red.) 1995. The molecular biology of plant mitochondria. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- [24] Liu F., Cui X., Horner H.T., Weiner H., Schnable P.S. 2001. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *Plant Cell* 13: 1063–1078.
- [25] Majewska-Sawka A., Rodriguez-Garcia M.I., Nakashima H., Jassem B. 1993. Ultrastructural expression of cytoplasmic male sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Sex. Plant Reprod.* 6: 22–32.
- [26] Michalik B. 2009. Mechanizmy umożliwiające produkcję nasion odmian mieszańcowych. W: Hodowla roślin z elementami genetyki i biotechnologii. Pod red. B. Michalik, PWRiL, Poznań: 220–228.
- [27] Nieuwhof M. 1990. Cytoplasmic-genetic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.). Identification of maintainers, inheritance of male sterility and effect of environmental factors. *Euphytica* 47: 171–177.
- [28] Ogura H. 1968. Studies on the new male-sterility in Japanese radish with special reference to the utilisation of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ.* 6: 39–78.

- [29] Sabar M., Gagliardi D., Balk J., Leaver C.J. 2003. ORFB is a subunit of F(1)F(O)-ATP synthase: insight into the basis of cytoplasmic male sterility in sunflower. *EMBO Rep.* 4: 1–6.
- [30] Schnable P.S., Wise R.P. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci.* 3: 175–180.
- [31] Seok-Hyeon N., Shi-Woo L., Gyun-Young J., Chee-Hark H., Seung-Gyun Y., Byung-Whan M. 2005. Development of molecular marker specific to a novel CMS line in radish (*Raphanus sativus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 111: 1191–1200.
- [32] Uyttewaal M., Mireau H., Rurek M., Hammani K., Arnal N., Quadrado M., Giege P. 2008. PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. *J. Mol. Biol.* 375: 626–636.
- [33] Wang Z., Zou Y., Li X., Zhang Q., Chen L., Wu H., Su D., Chen Y., Guo J., Luo D., Long Y., Zhong Y., Liu Y.G. 2006. Cytoplasmic male sterility of rice with boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell* 18: 676–687.
- [34] Wen L., Ruesch K.L., Ortega V.M., Kamps T.L., Gabay-Laughnan S., Chase Ch.D. 2003. A nuclear restorer of fertility mutation disrupts accumulation of mitochondrial ATP synthase subunit A in pollen of S male-sterile maize. *Genetics* 165: 771–779.
- [35] Wise R.P., Gobelman-Werner K., Pei D., Dill C.L., Schnable P.S. 1999. Mitochondrial transcript processing and restoration of male fertility in T-cytoplasm maize. *J. Hered.* 90(3): 380–385.
- [36] Yamagishi H., Terachi T. 1994. Molecular and biological studies on male sterile cytoplasm in *Cruciferae*. II. The origin of Ogura male sterile cytoplasm inferred from segregation pattern of male sterility in the F1 progeny of wild and cultivated radishes (*Raphanus sativus* L.). *Euphytica* 80: 201–206.
- [37] Yamagishi H., Terachi T. 1996. Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the *Cruciferae*. III. Distribution of Ogura-type cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 93: 325–332.
- [38] Yamagishi H., Terachi T. 1997. Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the *Cruciferae*. IV. Ogura-type cytoplasm found in the wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Plant Breed.* 116: 323–329.
- [39] Yang S., Terachi T., Yamagishi H. 2008. Inhibition of chalcone synthase expression in anthers of *Raphanus sativus* with Ogura male sterile cytoplasm. *Ann. Bot.* 102: 483–489.
- [40] Zhang H., Li S., Yi P., Wan C., Chen Z., Zhu Y. 2007. A Honglian CMS line of rice displays aberrant F(0) of F(0)F(1)-ATPase. *Plant Cell Rep.* 26: 1065–1071.
- [41] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda MD, USA

Male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.) – genetic and molecular background

Key words: radish, CMS, Ogura, *orf138*, *Rfo*, *PPR-B*, restorer

Summary

The aim of this study was to present the latest knowledge concerning the genetic background of male sterility trait (MS) in *Raphanus sativus* L.

Paper presents the latest research findings explaining the inheritance of male sterility in wild and cultivated populations of *R. sativus* and hypothesis about possible mechanisms of action of *MS* and *Rf* genes and the proteins they encode.

MS discovered in 1968 by Ogura in the Asian forms of *R. sativus* is a cytoplasmic-nuclear trait. The inability of plants to produce viable pollen is a result of mutation

in the mitochondrial gene *orf138* [8]. The second factor controlling the fertility of radish are nuclear restorer genes.

Genetic studies based on crosses between MS and fertile plants and their progeny clearly indicate the presence of at least four different nuclear genes that are able to restore fertility. It was shown that nuclear genes interact with each other on the basis of complementation or epistasis and their action may be modified by modifying genes and/or environmental conditions. At the molecular level complex *Rfo* locus has been described and characterized. It contains the gene encoding a protein of PPR family and has the capacity to reduce the accumulation of ORF138 protein.

The exact mechanism of CMS protein action is not known until now.

